MasterAim®hESC-皮肤类器官分化试剂盒

MasterAim® hESC-Skin Organoid Differentiation Kit

从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的整体解决方案

杭州艾名医学科技有限公司
官网：www.aimingmed.com
地址：浙江省杭州市滨江区江陵路88号
万轮科技园10幢南座1层
电话：0571 - 85352695

产品介绍

MasterAim®hESC-皮肤类器官分化试剂盒通过模拟体内皮肤分化微环境，支持人胚胎干细胞（hESC）经拟胚体（EBs）途径向皮肤类器官分化，保证皮肤类器官的大量获得。本试剂盒操作便捷，一次标准的分化流程能够在20天内将$1*10^6$个干细胞分化为100个具有表皮与真皮结构的皮肤类器官，持续培养至90天左右可实现毛囊结构发生。经本试剂盒构建的皮肤类器官，已通过严格的形态学、组织学、分子生物学与功能鉴定，可用于皮肤发育生物学、皮肤疾病模型构建、药物筛选与评价等研究。

产品信息

MasterAim®hESC-皮肤类器官分化试剂盒：皮肤类器官分化培养基及添加物，组分不单独售卖。

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®hESC-皮肤类器官分化试剂盒	10-100-874	1 盒 （198 mL）	-20°C，9个月
MasterAim®皮肤类器官分化培养基A	100-875	20 mL	-20°C，9个月；4°C，1个月
MasterAim®皮肤类器官分化培养基B	100-876	40 mL	
MasterAim®皮肤类器官分化培养基C	100-877	15 mL	
MasterAim®皮肤类器官分化培养基D	100-878	3 mL	
MasterAim®皮肤类器官分化培养基E	100-879	60 mL	
MasterAim®皮肤类器官分化培养基F	100-880	60 mL	

需要使用但本试剂盒中不包含的试剂

产品名称	推荐品牌与货号	规格
干细胞培养基	STEMCELL®, mTeSR™/Gibco, StemFlex™	500 mL
干细胞消化液	STEMCEL®, ReLeSR™/Gibco, Accutase™	100 mL
基质胶（干细胞培养）	Corning®, 354277	5 mL
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	MasterAim®, 100-184	500 mL
超低吸附96孔U型板	Corning®, 7007	/
超低吸附24孔板	Corning®, 3513	/

皮肤类器官构建

1. 拟胚体诱导（D0-D2）

（1）干细胞准备。提前复苏、传代培养hESC（推荐mTeSR™或StemFlex™ 培养基）。

注：建议使用复苏后稳定传代1~2次以上的干细胞；1次标准分化的干细胞需求约为$1*10^6$个或1孔6孔板70%~80%汇合度细胞量。

（2）清洗。去除6孔板内细胞培养基，用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。

（3）消化。加入0.5 mL干细胞解离液（推荐ReLeSR™或Accutase™解离液），轻轻晃动至消化液完全覆盖孔板底部。室温放置5~6 min后完全移除消化液，继续放置2~4 min至细胞完全脱落。

（4）收集。加入 2 mL MasterAim®皮肤类器官分化培养基 A（#100-875），将细胞完全转移至15 mL离心管中，300×g离心3 min。

（5）计数。完全移除上清液，用皮肤类器官分化培养基 A将细胞重悬至单细胞悬液，调整细胞密度至$3*10^4$个/mL待用。

注：总体积应不超过12 mL。

（6）EB形成。将单细胞悬液按0.1 mL/孔接种至超低吸附96孔U型板中，300×g离心3 min，置于37℃细胞培养箱中，静置培养1 d。

注：1次标准分化流程支持100个EB或类器官构建。

（7）加液。无需去除培养基，每孔加入0.1 mL MasterAim®皮肤类器官分化培养基B（#100-876），置于37℃细胞培养箱中，静置培养1 d。

2. 外胚层分化（D2~D11）

（1）收集。用剪口1000 μL吸头或巴氏吸管将EB连同培养基收集至15 mL离心管中。将离心管竖直静置数分钟，待EB自然沉降至管底后，尽量移除上清液。

注：不要吸走或触碰EB。

（2）清洗。用5 mL DPBS轻轻洗涤EB。将离心管竖直静置数分钟，待EB自然沉降至管底后，尽量移除洗涤液。重复此步骤2~3次。

注：不要吸走或触碰EB。

（3）培养。加入12 mL MasterAim®皮肤类器官分化培养基C（#100-877），上下颠倒混匀后，将EB连同培养基倾倒至10 cm细胞培养皿中。用剪口1000 μL吸头或巴氏吸管按1个EB/孔/0.1 mL转移至超低吸附96孔U型板中，置于37℃细胞培养箱中，静置培养3 d。

（4）加液。无需去除培养基，每孔加入25 μL MasterAim®皮肤类器官分化培养基D（#100-878），置于37℃细胞培养箱中，静置培养3 d。

（5）加液。无需去除培养基，每孔加入75 μL皮肤类器官分化培养基B，置于37℃细胞培养箱中，静置培养3 d。

3. 皮肤类器官分化（D11~D20）

（1）换液。每孔移除0.1 mL培养基，每孔再加入0.1 mL皮肤类器官分化培养基B，置于37℃细胞培养箱中，静置培养3 d。

注：不要吸走或触碰类器官。

（2）收集。用剪口1000 μL吸头或巴氏吸管将类器官连同培养基收集至50 mL离心管中。将离心管竖直静置数分钟，待类器官自然沉降至管底后，尽量移除上清液。

注：不要吸走或触碰类器官。

（3）清洗。用10 mL DPBS轻轻洗涤类器官。将离心管竖直静置数分钟，待类器官自然沉降至管底后，尽量移除洗涤液。重复此步骤2~3次。

注：不要吸走或触碰类器官。

（4）培养。加入50 mL MasterAim®皮肤类器官分化培养基E（#100-879），上下颠倒混匀后，分2次将类器官连同培养基倾倒至10 cm细胞培养皿中。用剪口1000 μL吸头或巴氏吸管按1个类器官/孔/0.5 mL转移至超低吸附24孔板中，置于37℃细胞培养箱中摇床上，震荡（65 rpm）培养3 d。

（5）每孔移除0.25 mL培养基，每孔加入0.25 mL MasterAim®皮肤类器官分化培养基F（#100-880），置于37℃细胞培养箱中摇床上，震荡（65 rpm）培养3 d。

注：不要吸走或触碰类器官；后续延长培养期间，每3天全换液1次。

【注意事项】

1.本产品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。

2.本试剂盒用于人胚胎干细胞（hESC）来源皮肤类器官的定向分化与构建，**不适用于人可诱导多能干细胞（hiPSC）分化。**

3.本试剂盒培养结果会受到培养条件因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。

【常见问题与解决方案】

1. EB形成失败

可能与干细胞状态、细胞活率、培养基失效等原因有关。建议使用复苏后稳定传代1~2次以上的干细胞，或经单克隆挑选后传代的干细胞；细胞活率高于90%；使用保质期内的皮肤类器官分化培养基A等。

2. 细胞球或类器官破碎

可能与细胞球收集或转移操作不当有关。由于细胞球在表皮/中胚层诱导及皮肤谱系分化阶段生长较快、结构相对脆弱，建议使用剪口的 1000 μL吸头或巴氏吸管进行细胞球转移操作；转移过程中应轻柔操作，避免剧烈吹打或反复吸打，以防止细胞球机械性损伤。

3. 类器官囊样结构（分化第8~10天左右）未形成

可能与接种数量过大、接种孔板边缘位置蒸发量大导致细胞因子浓度偏差过大、培养基失效等原因有关。建议严格控制EB接种时的细胞数量，2000~3000/孔最佳；使用水或DPBS填满孔板中的未接种孔，或使用带有分区内门的培养箱，降低边缘效应；严格按照实验流程操作，使用保质期内的皮肤类器官分化培养基A等。